



DE3636060

Biblio | Desc | Claims

**esp@cenet**

## Solid phase contg. particles carrying specific binding component

Patent Number: DE3636060

Publication date: 1988-05-05

Inventor(s): FRIESEN HEINZ-JUERGEN DR (DE)

Applicant(s): BEHRINGWERKE AG (DE)

Requested Patent:  DE3636060

Application Number: DE19863636060 19861023

Priority Number(s): DE19863636060 19861023; DE19863645090 19861023

IPC Classification: C12N11/02; C12N9/04; C07K17/02; C07K3/18; G01N33/53; G01N33/68

EC Classification: B01J20/28, G01N33/52C2, G01N33/543D, G01N33/543K4, G01N33/543H, G01N33/72

Equivalents: DE3645090

### Abstract

Porous solid phase is prep'd. by treating a porous, fibrous material with a dispersion or suspension of particles to which at least one binding partner (I), having biological affinity, is bonded, then removing the dispersion or suspension agent. The porous material is pref. paper; a membrane or a woven material. The particles may be of latex with (I)-covalently bonded to them; or are particles coated with Staph. aureus protein A or Streptococcus protein G, or they are cells of S.aureus, strain Cowan I, and immunoglobulins are bonded to such particles. The pref. latex particles have a core-shell structure, the shell being hydrophilic, and (I) bonded to the particles are e.g. receptors, lectins; proteins A or G; antigens, haptens; antibodies; enzymes or their inhibitors. The particles are applied as a 1-100 g/l suspension or dispersion then the impregnated porous material is dried conventionally.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(11) **DE 36 36 060 A1**

- (21) Aktenzeichen: P 36 36 060.0  
(22) Anmeldetag: 23. 10. 86  
(43) Offenlegungstag: 5. 5. 88

(51) Int. Cl. 4:

**C 12 N 11/02**

C 12 N 9/04

C 07 K 17/02

C 07 K 3/18

G 01 N 33/53

G 01 N 33/68

*Behördenpapier*

(71) Anmelder:

Behringwerke AG, 3550 Marburg, DE

(72) Erfinder:

Friesen, Heinz-Jürgen, Dr., 3550 Marburg, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Bioaffine poröse Festphasen, ein Verfahren zur Herstellung von bioaffinen porösen Festphasen und ihre Verwendung

Es wird eine bioaffine poröse Festphase enthaltend einen bioaffinen Bindungspartner und ein Verfahren zur Herstellung von porösen Festphasen beschrieben, die einen bioaffinen Bindungspartner enthalten, wobei in ein poröses Material eine Dispersion von Partikeln, an die der bioaffine Bindungspartner gebunden ist, eingebracht und anschließend das Dispergierungsmittel entfernt wird. Die genannten porösen Festphasen können zur Abtrennung des dem Bindungspartner entsprechenden Gegenpartners und zum Nachweis sowohl des Gegenpartners als auch des Bindungspartners verwendet werden.

**DE 36 36 060 A1**

**DE 36 36 060 A1**

## Patentansprüche

1. Poröse Festphase enthaltend einen bioaffinen Bindungspartner erhältlich dadurch, daß man in ein poröses aus Fasern bestehendes Material eine Dispersion oder Suspension von Partikeln, an die ein oder mehrere bioaffine Bindungspartner gebunden sind, einbringt und anschließend das Dispergierungs- oder Suspendierungsmittel entfernt.
2. Verfahren zur Herstellung einer porösen Festphase enthalten einen bioaffinen Bindungspartner, dadurch gekennzeichnet, daß man in ein poröses Material eine Dispersion oder Suspension von Partikeln, an die ein oder mehrere bioaffine Bindungspartner gebunden sind, einbringt und anschließend das Dispergierungs- oder Suspendierungsmittel entfernt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das poröse Material ein Papier ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das poröse Material eine Membran ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das poröse Material ein Vlies ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hohlräume des porösen Materials durch Gasentwicklung erzeugt wurden.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel Latexpartikel sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein bioaffiner Bindungspartner kovalent an die Partikel gebunden wurde.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel mit Protein A von *Staphylococcus aureus* beschichtet wurden oder Zellen von *Staphylococcus aureus* des Stammes CO-WAN I sind und Immunglobulin an die Partikel gebunden wurde.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel mit Protein G von *Streptococcus* der Gruppe C oder G beschichtet und Immunglobulin an die Partikel gebunden wurde.
11. Verwendung von porösen Festphasen hergestellt nach Anspruch 1 in Vorrichtungen zur Abtrennung und zum Nachweis des entsprechenden bioaffinen Gegenpartners sowie zum Nachweis des Bindungspartners in gelöster Form.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine bioaffine poröse Festphase und ein Verfahren zur Herstellung einer porösen Festphase, an die ein oder mehrere Bindungspartner eines bioaffinen Bindungssystems gebunden sind. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von derart hergestellten porösen Festphasen zur Bindung der dem Bindungspartner entsprechenden Gegenpartner.

Es sind poröse Festphasen, an die Bindungspartner von bioaffinen Bindungssystemen gebunden sind, in einer Vielzahl bekannt, wobei die Bindungspartner Enzyme, Lectine, Antigene, Antikörper oder Partner anderer bioaffiner Systeme sind.

Beispielsweise sind poröse Festphasen mit bioaffinen Bindungspartner in EPA 00 63 810 und in USP 43 66 241 beschrieben, bei denen die Bindungspartner adsorptiv oder kovalent mit dem Material der porösen Festphasen verbunden sind.

Weiterhin gibt es poröse Festphasen, die bioaffine

Bindungspartner enthalten, bei denen Latexpartikel, an die Bindungspartner gekuppelt sind, in Filmschichten inkorporiert sind (EPA 97 952 und DE-OS 33 29 728).

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß das 5 Einbringen von Partikeln, an die ein oder mehrere verschiedene bioaffine Bindungspartner gekuppelt sind, in vorgeformte Materialien mit isotrop poröser, das heißt geschäumter oder anisotrop poröser, das heißt fasriger Struktur möglich ist in einer Weise, daß die Partikel in 10 diesen Materialien fixiert werden.

Gegenstand der Erfindung ist eine poröse Festphase enthaltend einen bioaffinen Bindungspartner, erhältlich dadurch, daß man in ein poröses aus Fasern bestehendes Material eine Dispersion oder Suspension von Partikeln, an die ein oder mehrere bioaffine Bindungspartner gebunden sind, einbringt und anschließend das Dispergierungs- oder Suspendierungsmittel entfernt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von porösen Festphasen, enthaltend einen bioaffinen Bindungspartner, dadurch gekennzeichnet, daß man in ein poröses Material eine Dispersion oder Suspension von Partikeln, an die ein oder mehrere bioaffine Bindungspartner gebunden sind, einbringt und anschließend das Dispergierungs- oder Suspendierungsmittel entfernt.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer solchen porösen Festphase, enthaltend einen bioaffinen Bindungspartner, in Vorrichtungen zur Abtrennung und zum Nachweis des entsprechenden bioaffinen Gegenpartners sowie zum Nachweis des Bindungspartners in gelöster Form.

Das poröse Material kann in verschiedenen Formen ausgebildet sein. Beispielhaft sind Kugeln, Zylinder und flächenförmige Gebilde, wie Vliese und Membranen und Papiere.

Die porösen Strukturen können erzeugt werden durch Verschäumen oder durch Ausfällen mittels eines Fällbades von Lösungen oder Dispersionen synthetischer oder halbsynthetischer sowie natürlicher Polymere oder durch Verdunsten des Lösungsmittels aus Lösungen von membranbildenden Polymeren als auch durch Verpressen von Fasern, hergestellt aus den im folgenden genannten Polymeren.

Für die Herstellung der porösen Festphasen für diagnostische Mittel werden Vliese, Papiere oder Schwämme aus Zellulose oder Zellulosederivaten sowie Membranen aus Zellulosederivaten aus Polyamiden bevorzugt.

Die Partikel können Latexpartikel sein, die ganz aus einem harten Polymeren oder im Kern aus einem harten Polymeren bestehen. Beispiele für solche Polymere sind durch Suspensions- oder Emulsionspolymerisation herstellbare Polymere wie Polystyrole oder Polyacrylate.

Bevorzugt sind Latices, die einen Kern-Schale-Aufbau mit hydrophiler Schale haben.

An der Oberfläche der Latices sind die bioaffinen Bindungspartner adsorptiv oder bevorzugt kovalent gebunden, wobei die Bindungspartner Rezeptoren, Lectine, Protein A von *Staphylococcus aureus*, Protein G von *Streptococcus*, Antigene, Haptene, Antikörper, Enzyme oder deren Inhibitoren sein können.

Die Partikel können auch aus stabilisierten Zellen oder Zellfragmenten bestehen.

Bevorzugt tragen solche Zellen oder Fragmente zu 65 spezifischer Bindung befähigte Komponente wie etwa Rezeptoren, die Antikörper für den Fc-Teil binden, davon beispielsweise Protein A von *Staph. aureus* oder Protein G von *Streptococcus* der Gruppe C oder G,

Lectine, Antigene, Haptene, Antikörper, sowie über Protein A gebundene Antikörper, Enzyme oder deren Inhibitoren. Besonders bevorzugt sind ganze Zellen oder Membranfragmente von *Staph. aureus*, Stamm COWAN I, an die Antikörper gebunden sind wie von S. W. Kessler (J. Immunol., 1975, 115, 1617–1624) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann ausgeführt werden, indem man Dispersionen und Suspensionen der Partikel auf die vorbeschriebenen porösen Materialien aufträgt oder durch Eintauchen einbringt und anschließend die dabei eingebrachte Flüssigkeit durch Verdunsten entfernt. Die Abstimmung von Poren- und Partikelgröße sowie Partikelmenge und Volumen der porösen Matrix erfolgt so, daß die für den jeweiligen Testaufbau erforderliche Flüssigkeitsströmung in der Matrix nicht behindert wird.

Bei Membranen werden Porengrößen von  $0,1 - 12 \mu$  und Partikelgrößen von  $0,01 - 1 \mu$  bevorzugt. Die aufgebrachten Partikeldispersionen oder Suspensionen haben eine Konzentration von  $1 - 100 \text{ g/l}$ . Das Aufgeben der Suspension auf den Träger kann durch Auftröpfen, Aufpipettieren oder mit Hilfe von Pumpen und Kanülen punkt- oder strichförmig erfolgen. Das Trocknen kann durch Liegenlassen an der Luft, Überblasen von Luft bei Raumtemperatur oder erhöhter Temperatur in offenen oder geschlossenen Systemen bei Normaldruck oder im Vakuum erfolgen. Die Trocknungsbedingungen, insbesondere die erlaubte Thermobelastung werden durch die Stabilität der aktiven am Partikel gekoppelten Komponente bestimmt.

Die erfindungsgemäß hergestellten Festphasen können verwendet werden als biologisch aktive Festphasen wie etwa Enzym-, Antikörper-, Antigen- oder Hapten-Festphasen. Diese werden bevorzugt in diagnostischen Testelementen mit nebeneinander-, übereinander- oder gemischt neben- und übereinanderliegenden Zonen eingesetzt.

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung von Latex- und zellulären Festphasen sowie deren Verwendung in diagnostischen Testelementen mit nebeneinanderliegenden Funktionszonen gezeigt. Die Festphasen sind dabei sowohl Enzym- als Antikörper-Festphasen.

Die Beispiele sind keineswegs als limitierend zu betrachten, sondern dienen lediglich der weiteren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes.

### Beispiel 1

#### Glucoseoxidase enthaltende poröse Festphase

3 ml einer Dispersion, enthaltend  $50 \text{ g/l}$  Latex mit Acetalgruppen, hergestellt wie in Beispiel 2b von EPA 00 80 614 beschrieben, wurden mit wäßrigen Lösungen von  $300 \mu\text{l}$  normaler HCl und von  $300 \mu\text{l}$   $200 \text{ g/l} \text{ Tween } 20$  eine Stunde bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert. Es wurde dann durch Zugabe von  $250 \mu\text{l}$  1 normaler NaOH und gesättigter Lösung von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ein pH von 6,5 eingestellt. Anschließend wurden  $1,5 \text{ ml}$  einer Lösung von  $1 \text{ g/l}$  Glucoseoxidase mit einer Aktivität von  $250 \text{ U/mg}$  (Boehringer Mannheim, Reinheitsgrad 1, Best. Nr. 105 139) in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,2 (PBS) und  $1,5 \text{ ml}$  einer Lösung von  $5 \text{ g/l}$  Natriumcyanoborhydrid in PBS zugegeben und  $15 \text{ h}$  bei  $4^\circ\text{C}$  belassen. Dann wurden  $1,2 \text{ ml}$   $0,5 \text{ mol/l}$  Äthanolamin, eingestellt auf pH 8,5 mit HCl und  $0,3 \text{ ml}$  einer Lösung von  $25 \text{ g/l}$  Natriumborhydrid zugegeben und das Gemisch eine weitere Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  belassen. Nach Zen-

trifugation wurde das Sediment mit  $2 \text{ g/l} \text{ Tween } 20$  in PBS resuspendiert, wobei ein Volumen von  $15 \text{ ml}$  der Dispersion von Latex-Glucoseoxidase Konjugat erhalten wurde.

5 Streifen von Filterpapier der Firma Macherey und Nagel, Düren, Bundesrepublik Deutschland, Prod. Nr. 215, wurden mit  $40 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  der Dispersion von Latex-Glucoseoxidase Konjugat getränkt und anschließend bei  $20 - 50^\circ\text{C}$  getrocknet. In gleicher Weise wurden Membranen aus Zellulosemischester der Firma Millipore, USA, Prod. Nr. SCWP mit  $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  der Dispersion getränkt und getrocknet.

### Beispiel 2

#### Antikörper gegen humanes Myoglobin enthaltende poröse Festphase

2.1 Ein Konjugat von Latex und Kaninchen IgG mit Antikörpern gegen humanes Myoglobin wurde hergestellt, indem gemäß Beispiel 1 verfahren wurde, mit der Veränderung, daß anstelle der Lösung von Glucoseoxidase  $1,5 \text{ ml}$  einer Lösung von  $0,2 \text{ mg/ml}$  Kaninchen IgG mit Antikörpern gegen humanes Myoglobin verwandt wurde. Poröse Festphasen wurden hergestellt, wie in Beispiel 1 beschrieben.

2.2 Ein Konjugat von Zellen von *Staphylococcus aureus* (Stamm COWAN I) und Antikörper gegen humanes Myoglobin wurde wie folgt hergestellt: Zu  $50 \text{ ml}$  einer  $100 \text{ g/l}$  Suspension von *Staphylococcus aureus*-Zellen in einer  $9 \text{ g/l}$  Natriumchlorid enthaltenden  $0,05 \text{ mol/l}$  wäßrigen Natriumphosphatpufferlösung vom pH 7,4 wurden  $16 \text{ ml}$  einer Lösung von  $2 \text{ g/l}$  IgG vom Kaninchen, das Antikörper gegen humanes Myoglobin enthält, gegeben. Die Suspension wurde eine Stunde gerührt. Anschließend wurden die mit Antikörpern beladenen Zellen durch Zentrifugieren und Dekantieren vom Überstand abgetrennt. Die Zellen wurden in  $45 \text{ ml}$  des obengenannten Puffers resuspendiert und zur kovalenten Bindung des Antikörpers an den Zellen unter ständigem Rühren mit  $50 \text{ ml}$  einer Lösung von  $2 \text{ g/l}$  Glutardialdehyd in obengenanntem Puffer und nach einständigem Rühren mit  $50 \text{ ml}$  einer Lösung von  $50 \text{ g/l}$  Natriumsulfit in dem obengenannten Puffer versetzt.

Nach einer weiteren Stunde Rühren wurden die Zellen durch Zentrifugieren und Dekantieren vom Überstand abgetrennt. Die Zellen wurden gewaschen, indem sie in  $200 \text{ ml}$   $0,05 \text{ mol/l}$  wäßrigen Natriumphosphatpuffer von pH 7,4 resuspendiert wurden und durch Zentrifugieren und Dekantieren vom Waschpuffer abgetrennt wurden.

Die Festphasen wurden hergestellt, indem die so behandelten Zellen in PBS zu  $20 \text{ g/l}$  resuspendiert und wie in Beispiel 1 auf Filterpapier aufgetragen und eingetrocknet wurden.

### Beispiel 3

#### Testelement zur Bestimmung von Myoglobin, enthaltend eine poröse Festphase gemäß Beispiel 2.1

##### 3.1 Myoglobin-Peroxidase Konjugat

Es wurde elektrophoretisch einheitliches humanes Myoglobin und Peroxidase der Firma Boehringer Mannheim, Best. Nr. 413 470, verwandt. N-gamma-

Maleimidobutyryloxisuccinimid (GMBS) wurde von der Fa. Behring Diagnostics bezogen und wie von Tanimori et al., 1983, in J. Imm. Meth. 62, 123–131, beschrieben, mit humanem Myoglobin umgesetzt. 2-Iminothiolanhydrochlorid (Fa. Sigma, Kat.-Nr. I 6256) wurde wie von King et al., 1978, in Biochemistry 17, 1499–1506, beschrieben, mit Peroxidase umgesetzt. Aus dem Produkt der Umsetzung von GMBS mit humanem Myoglobin und der Iminothiolan-Peroxidase wurde ein Konjugat wie in Tanimori et al. beschrieben hergestellt. Das Rohkonjugat wurde durch Gelchromatographie an Ultrogel ACA 44 (Fa. LKB) gereinigt. Die Fraktion, in der etwa 1–2 Peroxidasemoleküle pro Molekül

bin in Enzygnost® IgE Verdünnungspuffer auf das Viskosevlies eines jeweiligen Testelements wurden nach 12 bis 13 min die Farbintensitäten, die auf der porösen Festphasen entstanden, mit dem für den Gehalt an Glucose im Blut geeichten Reflexionsphotometer ®Sanoquell der Firma Quelle, gemessen und folgende Meßwerte erhalten:

Myoglobin µg/ml	Meßsignal geeicht für µg Glucose pro dl Blut
10	115
100	110
1 000	70